

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-516724

(P2003-516724A)

(43)公表日 平成15年5月20日(2003.5.20)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
		1/40	B 4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
1/40		G 0 1 N 33/53	M
C 1 2 Q 1/68		37/00	1 0 2
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 34 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-533190(P2001-533190)  
 (86)(22)出願日 平成12年10月17日(2000.10.17)  
 (85)翻訳文提出日 平成14年4月30日(2002.4.30)  
 (86)国際出願番号 P C T / B E 0 0 / 0 0 1 2 3  
 (87)国際公開番号 W O 0 1 / 0 3 1 0 5 5  
 (87)国際公開日 平成13年5月3日(2001.5.3)  
 (31)優先権主張番号 9 9 8 7 0 2 2 6 . 0  
 (32)優先日 平成11年10月28日(1999.10.28)  
 (33)優先権主張国 欧州特許庁 (E P)

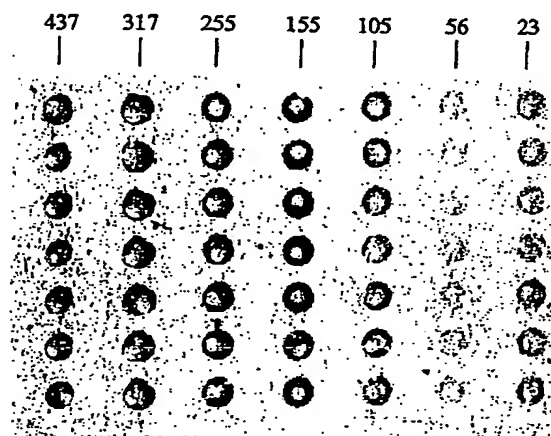
(71)出願人 ファキュルテ ユニヴェルシテール ノー  
 トルーダム ド ラ ベ  
 ベルギー, ペ-5000 ナムル, リュ  
 ド ブリュッセル 61  
 (72)発明者 レマクル, ジョゼ  
 ベルギー, ペ-5020 マロン, シエマ  
 ン デ ビエレ 14  
 (72)発明者 ザマテオ, ナタリ  
 ベルギー, ペ-5100 ジャンベ, アヴ  
 ェニュー ブルグメステル ジャン マテル  
 ネ 202/3  
 (74)代理人 弁理士 安達 光雄 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アレイ上で多数の相同核酸配列をスクリーニング及び/又は定量する方法及びキット

## (57)【要約】

本発明は、生物学的試料中に存在する他の相同配列から一つのヌクレオチド配列を検出及び/又は定量する新しい方法に関し：生物学的試料中に存在するオリジナルのヌクレオチド配列の少なくとも一部を標的ヌクレオチド配列へと増幅又は複製する工程：得られた標的ヌクレオチド配列を不溶性固体支持体に結合している対応した捕獲ヌクレオチド配列に接触させる工程：及び、相補的塩基対合によるハイブリダイゼーションの結果生ずる二本鎖ヌクレオチド配列の形成により生ずる信号を検出及び/又は定量する工程：を含み、前記捕獲ヌクレオチド配列が約40～約400塩基の(一本鎖の)長さを有すること、及び前記捕獲ヌクレオチド配列が固体支持体表面1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも五つの異なる結合した捕獲ヌクレオチド配列の密度を有するアレイによって不溶性支持体に結合されていることを特徴とする。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ー 生物学的試料中に存在するオリジナルのヌクレオチド配列の少なくとも一部分を標的ヌクレオチド配列へと増幅又は複製する工程（ただし、各々の標的ヌクレオチド配列はオリジナルのヌクレオチド配列の異なる場所に位置している）、

ー 得られた標的ヌクレオチド配列を不溶性固体支持体に結合されている対応する捕獲ヌクレオチド配列に接触させる工程、及び

ー 相補的塩基対合によるハイブリダイゼーションの結果生ずる二本鎖ヌクレオチド配列の形成により生ずる信号を検出及び所望により定量する工程を含む、生物学的試料中に存在しうる少なくとも四つの他の相同配列から一つのヌクレオチド配列を検出及び／又は定量する方法において、前記捕獲ヌクレオチド配列が約40～約400塩基の（一本鎖の）長さを有すること、及び前記捕獲ヌクレオチド配列が固体支持体表面1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも五つの異なる捕獲ヌクレオチド配列の密度を有するアレイによって不溶性支持体に結合されていることを特徴とする方法。

【請求項2】 捕獲ヌクレオチド配列及び標的ヌクレオチド配列の長さが約50～約300塩基、好ましくは約100～約200塩基である請求項1記載の方法。

【請求項3】 捕獲ヌクレオチド配列の長さが、標的ヌクレオチド配列の長さに対して50%未満異なっている請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】 検出される異なる標的ヌクレオチド配列が、相互の間で30%より高い、好ましくは60%より高い、更に好ましくは80%より高い相同性を有する請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】 不溶性固体支持体が、ガラス、電子装置、シリコン支持体、プラスチック支持体、コンパクトディスク、フィルター、金属支持体又はそれらの組合せからなる群より選択される請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】 検出及び／又は定量される標的ヌクレオチド配列の長さが、生物学的試料中で検出及び／又は定量されるオリジナルのRNA又はDNAヌクレオチド配列の3'末端を逆転写又は増幅させるための特異的プライマーを使用

することによって決定される請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】 検出及び／又は定量される標的ヌクレオチド配列の長さが、生物学的試料中で検出及び／又は定量されるオリジナルのRNAヌクレオチド配列を逆転写させるための特異的プライマー及びブロッキングヌクレオチド配列を使用することによって決定される請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】 生物学的試料中で検出及び／又は定量されるオリジナルのヌクレオチド配列がrRNA、好ましくは16S、23S、18S及び28S rRNAからなる群より選択される請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】 生物学的試料中で検出及び／又は定量されるオリジナルのヌクレオチド配列が、ブドウ球菌属の種のFemA特異的な遺伝子配列、好ましくはスタフィロкокカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)、スタフィロкокカス・エピダーミディス(*Staphylococcus epidermidis*)、スタフィロкокカス・サプロフィティカス(*Staphylococcus saprophyticus*)、スタフィロкокカス・ホミニス(*Staphylococcus hominis*)及び／又はスタフィロкокカス・ハエモライティカス(*Staphylococcus haemolyticus*)株のFemA遺伝子である請求項1～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】 不溶性固体支持体を含む診断及び／又は定量キット又は装置であって、前記固体支持体の上に、検出及び／又は定量される標的ヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイゼーションすることができる一本鎖捕獲ヌクレオチド配列が結合、好ましくは共有結合されており、前記一本鎖捕獲ヌクレオチド配列が固体支持体表面1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも五つの異なる結合された一本鎖捕獲ヌクレオチド配列の密度を有するアレイによって固体支持体の表面上に配置されており、前記一本鎖捕獲ヌクレオチド配列が約40～約400塩基の長さを有する診断及び／又は定量キット又は装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の分野

本発明はアレイ上で多数の相同核酸配列を同時に検出及び／又は定量するための試薬を含む方法及びキットに関する。

## 【0002】

発明の背景及び従来技術

小型化、特にアレイ技術の発展は、生物学的試料中に存在する多数のヌクレオチド配列の同時検出を可能にする。アレイはその表面に捕獲ヌクレオチド配列を有する一連の不連続領域を含み、前記捕獲ヌクレオチド配列は、対応する標的ヌクレオチド配列とハイブリダイゼーションによって結合することが可能である。もし最後のヌクレオチド配列が標識されていたら、信号は結合場所で検出及び測定され、その強さは、試料中に存在する標的配列の量の推定値を与える。

## 【0003】

所望の配列を得るために伸長中のオリゴヌクレオチドに新しいヌクレオチドを添加することを含む各々の工程でマスクを使うことによって、支持体上の特定の場所の特定のオリゴヌクレオチド配列の存在を得ることができることは知られている。このマスク技術は、写真平版技術から由来しており、新しいヌクレオチドが添加される前に放出される光保護基の使用と結びつけられている。得られたアレイは数千の不連続ドメインを含むことができ、その各々は、何千という標的配列の検出のための捕獲ヌクレオチド配列として特異的オリゴヌクレオチドを担持する。短いオリゴヌクレオチドのみが表面上に存在し、アレイ上に存在する特異的オリゴヌクレオチドに対応する陽性スポットのパターンにおいて配列を決定又は同定するために使用される。標的配列の同定は、前記パターンと対照との比較によってなされる。文献WO97/29212及びWO98/28444は単一のヌクレオチドによって異なることができる二つの異なる配列の分析を可能にする30ヌクレオチド未満の捕獲ヌクレオチド配列を使用する同様の技術を記載している。短い捕獲ヌクレオチド配列（10～20ヌクレオチド）が好まれる。というのも、捕獲ヌクレオチド配列の長さが短いほど1塩基が異なる二つのオリゴ

ヌクレオチド間の相違は大きいからである。

【0004】

しかしながら、長い標的断片（例えばmRNAのcDNAコピー）に対しては数個の断片が同じヌクレオチド配列を認識することが可能であり、ハイブリダイゼーションの速度は遅い。従って、断片は短い種類のものに切断され、方法は、所定の遺伝子の存在を証明する信号のパターンを得るために多数の捕獲ヌクレオチド配列の使用を必須とするべきである（WO97/10364及びWO97/27317）。この場合、好ましくは約45ヌクレオチド、実際には10～25ヌクレオチドの短い捕獲配列が用いられる。

【0005】

文献US-5605662は完全なヌクレオチド配列の電気ベースのチップのプロットへの結合を記載しており、各々のプロットは特異的オリゴヌクレオチドの配列を有する。標的配列はチップ上にスポットされ、その後特異的な短い標識されたヌクレオチドは標的へのそれらの結合を測定するためにインキュベートされる。プロットの電荷の変化は1塩基が異なる様々なヌクレオチドの識別を可能にし、特異的なSNP分析を可能にする（Gilles等 1999, Nature Biotechnology 17, p.365 (1999)）。

【0006】

文献WO94/22889は電氣的重合化ステップにおいて使用されるピロル基を有するあらかじめ構築されたオリゴヌクレオチドから作成された電子チップを記載しており、これは導電性重合体の形成を可能にする。この方法は短い捕獲ヌクレオチド配列を有する電氣的チップの調製に特に適している。

【0007】

アレイ上に固定された短い又は長い捕獲ヌクレオチド配列を使用するアプローチは、診断目的に適応された時、特に相互の間で高い相同性を有する異なる配列が同じマイクロアレイ上で同時に検出及び所望により定量されなければならない時には、最適な条件ではない。

【0008】

発明の目的

本発明は、一本鎖捕獲ヌクレオチド配列上でのハイブリダイゼーションによる異なる又は同一の生物から由来するヌクレオチド配列、好ましくは多数の相同配列の検出及び所望による定量を改良する新しい方法であって従来技術の欠点を示さない方法を提供することを目的とする。

#### 【0009】

##### 発明の概要

本発明者は、たとえ多数の配列が相同性を有し、分析に供された試料中に同時に存在するとしても、アレイ上の多数のヌクレオチド配列の高感度の検出方法（所望により定量と結びつけられる）を提供することができることを発見した。現在までは、感度が低いか又は無いか、又は同じ捕獲ヌクレオチド配列上で異なる（しかし相同性のある）標的配列間の交差反応活性があった。

#### 【0010】

一つの前記せぬ観察は、所定の標的配列が様々な長さの対応する捕獲ヌクレオチド配列を有するアレイでインキュベートされる時に得られる結果であった（実施例2及び図1）。（実験の前に変性させられたばかりの）二本鎖の増幅単位（amplicon）からなる標的配列を用いると、長すぎる又は短かすぎる捕獲ヌクレオチド配列の使用は捕獲ヌクレオチド配列が標的配列と同じ長さを有する場合に得られた信号と比較して、より低い信号（時にはかなり低い信号）を与えた。最高の感度は中程度の長さ及び標的増幅単位と同様の大きさを有する捕獲ヌクレオチド配列で得られる。非常に長い標的増幅単位に対しては、状況はさらに複雑であり（増幅単位の再結合、二次構造、……等）、また配列の性質に依存する。マイクロプレート上の長い標的増幅単位のサンドウィッチハイブリダイゼーションにおいては、至適捕獲ヌクレオチド配列は50～500塩基であることが見出されている（WO98/11253）。

#### 【0011】

本発明は、生物学的試料中に存在しうる少なくとも四つの他の相同配列から一つのヌクレオチド配列をその配列の一部を同定することによって検出及び／又は定量する（既知の技術に比べ感度及び特異性において改良がなされた）方法に関し、前記方法は以下の工程を含む：

- ー 所望により、生物学的試料からオリジナルのヌクレオチド配列を抽出する工程、
- ー オリジナルのヌクレオチド配列の少なくとも一部分を標的ヌクレオチド配列へと増幅又は複製する工程（ただし、各々の所望の標的ヌクレオチド配列はオリジナルの配列の異なる場所に位置している）、
- ー 所望により二本鎖標的ヌクレオチド配列を一本鎖標的ヌクレオチド配列へ変性させる工程
- ー 様々な方法（制限酵素、NaOHの添加、等）によって所望により、前記配列を約40塩基対より長く約400塩基対より短い長さ（又は後述される好ましい長さ）を有する短い標的ヌクレオチド配列へと開裂する工程、
- ー 所望により前記標的ヌクレオチド配列を標識する工程、
- ー 得られた標的ヌクレオチド配列を不溶性固体支持体に結合されている（連結されている又は固定されている）対応する捕獲ヌクレオチド配列に接触させる工程（ただし前記捕獲ヌクレオチド配列は約40～約400塩基、好ましくは約50～約350塩基、さらに好ましくは約100～約300塩基、さらにより好ましくは約120～約200塩基の（一本鎖の）長さを有し、前記捕獲ヌクレオチド配列は、固体支持体表面1cm<sup>2</sup>当たり少なくとも五つの異なる結合した捕獲ヌクレオチド配列の密度を有するアレイによって不溶性固体支持体に結合している）。

#### 【0012】

本方法はまた、塩基対合による（捕獲及び標的ヌクレオチド配列の）ハイブリダイゼーションの結果生ずる二本鎖ヌクレオチド配列の形成により（好ましくは標的ヌクレオチド配列の標識からの）信号を検出及び／又は所望により定量する工程も含む。

#### 【0013】

（当業者からの公知技術を用いた）標識化は（もし方法が増幅工程を含む場合は）変性する前の増幅された配列上に得られることが好ましい。

#### 【0014】

本発明による方法は、従来技術（WO97/02102）に記載されているよ

うに標準パターンと得られるハイブリダイゼーションパターンを比較することなしに、特異的標的ヌクレオチド配列（一つのスポット＝一つの特異的配列）の同定（位置）又は患者（そこから生物学的サンプルが得られた）に対して特異的な微生物又は遺伝的特徴（多形、遺伝病、がんの診断及びモニタリング、等）の存在を検出の信号と関連づける工程をさらに含むことができる。生物学的試料は微生物又は汚染物が存在するいかなる培養液であることができるし、又は植物又は動物（人間を含む）の器官、組織、細胞又は生物学的液体から得られる抽出物であることができる。

#### 【0015】

本発明による方法の様々な工程は、当業者には周知の及び文献に記載されている様々な手段で行われることができる。

#### 【0016】

本発明による方法は、不溶性固体支持体の表面  $1\text{ cm}^2$  当たり少なくとも五つの異なる結合された捕獲ヌクレオチド配列の密度を有するアレイによって捕獲ヌクレオチド配列が配置（好ましくは共有結合によって固体支持体に結合）されている不溶性固体支持体を少なくとも含む特定の診断及び／又は定量キットを用いることによって行われることができる。前記捕獲ヌクレオチド配列は約40～約400塩基の長さ又は好ましくは上述のような長さを有する。

#### 【0017】

本発明による方法及びキットにおいては、固体支持体のアレイ上の捕獲ヌクレオチド配列の密度は例えば固体支持体表面  $1\text{ cm}^2$  当たり10以上、20以上、50以上、100以上、1000以上、10000以上又はさらに多数の捕獲ヌクレオチド配列を有することによって高められることができる。好ましい実施態様においては、各々の捕獲ヌクレオチド配列が支持体の特定の領域に位置する。しかしながら、いくつかの捕獲ヌクレオチド配列は特定の情報を得るために同じ領域に存在することもできる。

#### 【0018】

本発明によるキットは本発明による方法を（好ましくは自動で）行う様々な媒体又は装置を組み入れてもよい。前記キットは例えば分析される生物学的試料中



に存在する多数のヌクレオチド配列の検出及び／又は定量のための高処理能力スクリーニング装置の如き自動装置に含まれることができる。前記キット又は装置は本発明による方法のすべての工程又はいくつかの特定の工程のみを行うのに適応されることができる。

#### 【0019】

本発明による方法、キット又は装置においては、一本鎖捕獲ヌクレオチド配列の長さは検出及び／又は定量される標的ヌクレオチド配列の長さと全く同じであることが好ましいが、異なってもよい。その異なり方は好ましくは全長の50%未満、さらに好ましくは全長の30%未満、さらにより好ましくは全長の10%未満である。

#### 【0020】

本発明による方法、キット又は装置は、DNA又はRNAからなる標的ヌクレオチド配列の検出及び／又は定量に好適であり、前記標的ヌクレオチド配列はそれらの全長と部分的に又は全体的に相同性のある配列を含む。

#### 【0021】

本発明による方法は、異なるオリジナルのヌクレオチド配列が相互の間で30%より大きい、60%より大きい、又は80%よりさらに大きい相同性を有するか又は数塩基しか異なっていないときでさえ、行われることができる。

#### 【0022】

本発明による方法、キット又は装置においては、捕獲ヌクレオチド配列は不溶性固体支持体上に、好ましくは後述のようにそれらの一方の末端によって共有結合（又は固定）されていることが有利である。

#### 【0023】

本発明による方法を用いると、ハイブリダイゼーション収率は有利には10%、50%、70%、80%又は90%より大きくなり、又はほぼ100%に達することができる。

#### 【0024】

本発明による方法、キット及び装置は（例えば、定量のために用いられる標準ヌクレオチド配列との、異なる微生物の株の共通配列との、又は微生物による所

望の抗生物耐性の検出を可能にする配列とのハイブリダイゼーションを可能にすることによる) 他の結合された捕獲ヌクレオチド配列の使用、又は他の非相同配列の使用を含んでいてもよい。前記他の捕獲ヌクレオチド配列は、所望により400塩基より長い長さを有し、不溶性固体支持体(バイオチップ)上に、好ましくは他の結合された捕獲ヌクレオチド配列で作成されたアレイ中に、結合されている。

#### 【0025】

本発明による固体支持体は、ガラス、電子装置、シリコン又はプラスチック支持体、コンパクトディスク、フィルター、金属支持体、又はそれらの組合せからなる群より選択される材質であることができるか又はこれらの材質から形成することができる。有利には、前記固体支持体は単一のガラス平板であり、これは本発明による方法を改良するためにさらなる手段(バーコード、マーカ等)又は媒体(コーティング等)を含むことができる。

#### 【0026】

本発明による方法で使用される増幅工程は、周知の増幅方法によって得られることが有利であり、好ましくはPCR、LCR、CPR、NASBA、ICR又はAvalanche DNA技術からなる群より選択される。

#### 【0027】

有利には、検出される標的ヌクレオチド配列の長さは、特にそれがRNA配列の場合には、検出及び/又は定量されるオリジナルの生物学的ヌクレオチド配列の3'末端又は5'末端の逆転写用の特異的なプライマー(及び所望によりブロッキングヌクレオチド配列)を使用することによって決定される先に同定した増幅方法の条件によって決定される。有利には、前記RNA配列は16S及び23S rRNA配列又は18S及び28S rRNA配列である。

#### 【0028】

本発明の好ましい実施態様においては、複製又は増幅される標的ヌクレオチド配列は、対応した(相同性のある)DNA又はRNAのオリジナルの生物学的ヌクレオチド配列の異なる部分から得られる。

#### 【0029】

本発明の好ましい実施態様においては、増幅に使用されるプライマーはその3'末端において相同配列のうちの一つに特異的な塩基を有することが好ましい。

#### 【0030】

本発明のさらなる側面によれば、本発明による方法、キット又は装置は、生物学的試料中に一緒に又は別々に存在する様々なブドウ球菌属の種又は変種、好ましくはスタフィロコッカス・アウレアス、スタフィロコッカス・エピダーミディス、スタフィロコッカス・サプロフィティカス、スタフィロコッカス・ホミニス、又はスタフィロコッカス・ハエモライティカスの検出及び／又は定量のために使われることが有利である。前記検出は、参考文献としてここに組み入れられる文献WO99/16780に記載されているように、好ましくはFemA遺伝子配列中の特定の位置を使用することにより前記様々な種におけるFemA遺伝子の遺伝的変異を検出することによって得られる。

#### 【0031】

好ましくは、増幅産物を得るために用いられる前記FemA配列のプライマー及び特定部分は実施例で後述されているものである。

#### 【0032】

本発明による方法は、(所望により増幅又は複製後の)標的ヌクレオチド配列と同様の条件において固体支持体のアレイ上に結合されている捕獲ヌクレオチド配列に接触させられることができる標準ヌクレオチド配列(外部又は内部標準)を使用することによって標的ヌクレオチド配列の定量を得るための手段を含んでもよい。前記手段は、捕獲ヌクレオチド配列と標準ヌクレオチド配列との間の相補的な塩基対合によって形成される二本鎖ヌクレオチド配列の形成により生ずる信号を定量する工程、及び、前記二本鎖ヌクレオチド配列の形成により生ずる信号と生物学的試料中で検出及び／又は定量されるオリジナルのヌクレオチド配列の存在を定量するために捕獲ヌクレオチド配列と標的ヌクレオチド配列との間の相補的な塩基対合によって形成される二本鎖ヌクレオチド配列により生ずる信号との間の相関分析の工程を含む(参考文献としてここに組み入れられている文献WO98/11253も参照)。前記標準ヌクレオチド配列(外部及び／又は内部標準)は、本発明によるキット又は装置に含まれることが有利であり、所

望により本発明による様々な工程（例えば、ハイブリダイゼーション及び培養液、ポリメラーゼ、酵素、標準配列、及び標識分子）を行うのに必須の媒体及び装置を有する。

#### 【0033】

本発明は添付された図面を参照して、以下の非限定的実施例において詳細に説明される。

#### 【0034】

##### 図面の簡単な説明

図1は標的増幅単位のハイブリダイゼーション収率に対する捕獲ヌクレオチド配列の長さの影響を示す。標的配列は155塩基の長さであり、100fモルが23～437塩基の長さの一本鎖捕獲ヌクレオチド配列を含むチップ上でインキュベートされた。捕獲ヌクレオチド配列の長さは図中に示されている。

#### 【0035】

図2は五つの異なる種のブドウ球菌属のFemA検出を模式的に表す。五つのブドウ球菌属の種に属する五つの異なる配列のうちの一つを特異的に増幅させるために用いられる5対のプライマーの位置がFemA配列上に示されている。共通配列も、すべてのブドウ球菌属の種に共通の二つのプライマーを用いることによって増幅される。標識された増幅配列はその後チップ上でハイブリダイズされる。

#### 【0036】

図3は一つの開始ヌクレオチド配列を使用する5'末端における、又は開始ヌクレオチド配列及びブロッキングヌクレオチド配列の両方を使用する配列に沿ったrRNAの配列の小部分の複製によるrRNAの検出を模式的に表す。小さな複製断片は次にチップのアレイ上にハイブリダイズされる。

#### 【0037】

##### 定義

「ヌクレオシド3リン酸」という用語は、DNA又はRNA中に存在するヌクレオシドを意味し、従って塩基として、アデニン、シトシン、グアニン、チミン及びウラシル又は他の変性された塩基（例えば8-アザグアニン及びヒポキサチ

ン) をデオキシリボース又はリボースである糖成分に組み入れたヌクレオシドを含む。

#### 【0038】

ここで使用される「ヌクレオチド」という用語は前記核酸の塩基と比較して核酸(DNA又はRNA)に存在するヌクレオシドを意味し、上述の如く通常の又は変性された塩基を含むヌクレオチドを含む。ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及びその類似物質の意味はハイブリダイゼーション特性は損なわれない(主鎖は等価の合成ペプチド、ペプチド核酸(PNA)によって置換されもよい)という条件のもとで糖リン酸の主鎖が変性及び/又は置換される類似種を含む。

#### 【0039】

プライマー配列は、ハイブリダイズする状況下ではプライマーが遺伝的増幅に使用されることができるという条件のもとで、増幅又は複製される鋳型の正確な配列を反映する必要はない。不適切に組み合わせられた塩基は、変化したハイブリダイゼーションストリンジェンシー(同一プライマーによる相同配列の同一領域の増幅又は複製)を提供するためにプライマー配列に導入されることができる。

#### 【0040】

「捕獲又は標的ヌクレオチド配列、標的核酸、特異的にハイブリダイズすること、バックグラウンド、定量」という用語は参考文献としてここに組み入れられているWO97/10365において規定されたのと同様に規定される。

#### 【0041】

「相同配列」は対応した場所で同一ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列のことを意味する。それらは一般的に配列間の相同性(又は配列の同一性)の最小値として規定され、そこでは配列を最適にアライメントした後の同一ヌクレオチドの百分率は、(異なる生物のように遺伝的に異なるソースに存在する所定の遺伝子の配列又は同一ファミリーのタンパク質又は酵素に対する)付加又はギャップのような欠失も考慮されている。相同性(又は配列同一性)の程度は非常に多様であり得る。というのも、相同配列は一つ又はいくつかの場所のみで、又は完全な配列に沿ったすべてであってもよいからである。両配列において同一の部分の配列は保存されていると称される。高い不変性又は相同性を示す配列は高く保

存されていると称される。

#### 【0042】

配列のアライメント方法はコンピューター化された局地的な相同性アルゴリズムに基づいており、例えばC l u s t a l (登録商標) (Intelligenetics, Mountain Views, California)、又はG A P (登録商標)、B E S T F I T (登録商標)、F A S T A (登録商標)、及びT F A S T A (登録商標) (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group Madison, Wisconsin, USA) 又はB o x s h a d e (登録商標) として入手可能である (しかしこれに限定されるわけではない)。

#### 【0043】

##### 発明の詳細な説明

100～200塩基の標的配列の増幅及び100～200塩基の捕獲ヌクレオチド配列へのハイブリダイゼーションは、相同配列のディファレンシャル診断によって生じる多数の問題を解決することを可能にする。しかしながら、40塩基までの短いもの (特に捕獲ヌクレオチド配列の場合) 及び400塩基までの長いものも使用されることができ (複製された二つのプライマー及びいくつかの配列の使用を必要とする増幅工程によって、主に制限される)。所定の標的配列に対する捕獲ヌクレオチド配列の減少は感度の減少をひき起こすが、特異性の増加をひき起こす。長い標的配列は図2に示されているように同じ配列上に様々な標的増幅単位を設計する可能性を制限する。それは特異性を減少させ、ハイブリダイゼーション率を減少させる2次構造に導きうる。

#### 【0044】

標的DNA配列はプライマーを使用するPCRのような古典的方法によって増幅され、その結果小さな断片が作成され、これは次に対応した捕獲ヌクレオチド配列を有するアレイ上でのハイブリダイゼーションのために用いられる。RNAはcDNAへと複製及び逆転写され、必要とあらば同じ方法で増幅される。

#### 【0045】

試料中に検出される配列間の相同性があまり高くない (典型的には30～60%) 場合、相同配列は (例えば同一プライマーを使用することによって) 増幅又

は複製され、識別は本発明において提案されているように中程度の長さの捕獲ヌクレオチド配列を用いるアレイ上で得られる。同一プライマーの使用は、配列のいくつかの部分が一定の距離で類似している又は同一である場合は可能であり、それは増幅工程を容易にする。しかしながら配列は幾分か異なっているので、中程度の長さの捕獲ヌクレオチド配列上で特異的にそれらを捕獲することを可能にする。標的及び捕獲ヌクレオチド配列の両方が、類似した長さであるという事実は検出を高感度にする。

#### 【0046】

しかしながら、高い相同性（例えば60%より高い）を有するいくつかの配列が分析されなくてはならない場合、捕獲ヌクレオチド配列上のハイブリダイゼーションによる識別だけで常に十分というわけではない（同一捕獲ヌクレオチド上の二つの相同配列間の交差反応）。従って、標的配列の異なる小断片が増幅又は複製される。これらの断片は異なる標的に対して配列の異なる部分に位置している。これらの位置のいくつかの部分は重複している可能性があるので、位置は完全にはないが、部分的にのみ識別される。この状況は、異なる標的ヌクレオチド配列による捕獲ヌクレオチド配列上での交差反応がない限り、本発明と一致している。これらの小さな断片は次に中程度の長さのそれらの特異的捕獲ヌクレオチド配列上で検出される。高感度は、検出する配列と類似した中程度の長さの捕獲ヌクレオチド配列の使用で得られる。特異性は、まず増幅又は複製される各々の配列に対する特異的なプライマーを用いた増幅中に、次にマイクロアレイ上で得られる。試料分析のためには、異なるプライマーがバイオチップの分析以前にマルチプレックスPCR増幅において、一緒に使用される。好ましくは、検出する配列に特異的な塩基を3'末端に有している各々の標的に対して特異的なプライマーを使用してもよい。その結果、（適切な状況では）対応する塩基を有する標的配列のみがポリメラーゼによって複製及び増幅されるだろう。

#### 【0047】

代替法においては、半共通マルチプレックスPCRは全配列に共通のプライマー及び各々の相同配列に特異的な第二のプライマーを使用することによって試験される。中程度の長さの特異的捕獲ヌクレオチド配列は全部の標的配列の異なる

部分において各々の配列のために選択された。

#### 【0048】

前述の方法と結びつけられることが可能なもう一つの代替法においては、同じ標的の異なる部分を認識する多数の捕獲ヌクレオチド配列が、所定の増幅配列の異なる部分に結合する二つ又は三つの捕獲ヌクレオチド配列を含むアレイに固定される。これらのスポットの各々に対して生ずる信号は所定の標的配列に対して所定の比率にある。一方、それは、二つの配列間の相同性が均質でない（ある部分では非常に異なっているが他の部分では保存されている）ために部分的に交差反応する他の配列について異なる。

#### 【0049】

多数のコピーが細胞内に多量に存在するRNA（例えば原核生物の細胞における16S又は23S rRNA又は真核生物の細胞における18S又は28S rRNA）に対する分析は必ずしも増幅を必要としない。マイクロアレイ上のそれらのハイブリダイゼーションに基づく検出は特に好適である。というのも、それらは異なる種間で高い相同性を示すからである。複製を開始するプライマー及びRNAに結合して逆転写酵素による複製を停止するブロッキングヌクレオチド配列を使用することによって、RNAの特定の部分を複製できる可能性がある（実施例5）。このブロッキングオリゴヌクレオチドは3'末端をブロックされているので、複製を開始するために転写酵素によって使用されることができない。最も単純な3'ブロックはデオキシ3'炭素であるが、他にも3'炭素でのピロフォスフェートの存在又は2', 3'-ジデオキシ炭素も機能する。このブロッキングオリゴヌクレオチドの5'末端は例えば転写酵素をブロックするためにNH<sub>2</sub>基によって変性されている。プライマーは、一層特異的なコピーを作成するために、所定の配列の特異的な塩基を3'末端において有することも可能である。従って異なる生物のrRNAの異なる特定の部分はアレイ上でのそれらの検出を明瞭にするよう複製されることができる。というのもそれらの配列のみでなくそれらの位置も又特異的になるからである。

#### 【0050】

RNAの同一コピーはcDNAに転写され必要とあらばPCRによって増幅さ



れることのできるメッセンジャーRNA (mRNA) を用いて得られることができる。

#### 【0051】

化学の発展は特定の官能基を有するヌクレオチドのガラスへの共有結合を可能にする(Lamtire等、Nucleic Acid Res. 22, pp.2121-2125(1994))。オリゴヌクレオチドに存在するアミノ末端基を使用することによってアレイ上に存在するアルデヒド基上へのヌクレオチドの共有結合を得ることが可能である。捕獲ヌクレオチド配列は化学的に合成されるか又はPCR (増幅単位) によって作成され、そして機能化されたガラスにロボットによって結合され、その後一本鎖にされる。捕獲ヌクレオチド配列は検出される標的DNAに関連した相補的な配列及び同一ではないとしても類似の長さを有する。長さの50%の相違はなお高感度の結合を与える。アレイはスポットを限定する所定の位置において捕獲ヌクレオチド配列を付着させる適切な自動機械によって構築される。各々の捕獲ヌクレオチド配列のトリプリケートに加えてネガティブ及びポジティブコントロール (及び所望の標準配列) が使用される。アレイは典型的に20~100スポットを含むが、400スポット、1000スポット、又は10000スポット又はそれ以上のスポットのアレイが可能である。1cm<sup>2</sup> 当たり400スポットを有するアレイは0.2mmのピンを用いて低価格で得られる。捕獲ヌクレオチド配列が十分な数存在するとき、それは既知の検出装置を用いた高解像度でのこれらのスポットの検出を可能にする。

#### 【0052】

ニトロセルロース又はナイロンのフィルターのような他の支持体もアレイのために提案される。しかしながら、これらのフィルター上のDNAの結合部位は配列に沿ってランダムであり、後ほどハイブリダイゼーションに利用される利用可能な一本鎖配列の大きさを予測するのは不可能である。

#### 【0053】

オリゴヌクレオチド配列の結合は直接的又は間接的な反応においてこれらの支持体上への共有又は非共有結合によって得られることができる。一つの一般的な方法は、ストレプトアビジンでコートされた表面上でのビオチン化オリゴヌクレ

オチドの結合又はオリゴヌクレオチドに対する結合親和力を有するタンパク質の使用によってガラス又はプラスチックにポリリジンが付着された表面上に、捕獲ヌクレオチド配列をスポットすることである (EP-A-0491059)。

#### 【0054】

ゲル層 (US-A-5552270及びEP-0535242)、オリゴヌクレオチドを有するビニル基を持つアクリルアミドの共重合 (US-A-5736257) 又はオリゴヌクレオチドの共有結合のために活性化されることのできる他の支持体はアレイのために使用されることができる。CD上に存在するポリカーボネートのようなプラスチックは捕獲ヌクレオチド配列を固定及びバイオ-CDアレイとして使用されるために活性化された (WO99/35499)。

#### 【0055】

2本のDNA鎖又はRNA鎖の間のハイブリダイゼーションは、特定の方法でそれら自体を認識するいくつか (4~5) のヌクレオチドの結合によって始まる複雑な過程であり、それらがいったん結合されると、極めて速い過程である熱力学的に好ましい結合の伸長が配列に沿って生ずる。従って結合は運動学的及び熱力学的パラメーターの両方に依存しており、実験の条件はそれらの両方を変化させるために適応されることができる。温度は運動学的過程を加速するが、標的の最大の結合を得るために用いられる温度には最適なものが存在する。塩濃度はストリンジェンシーな条件を変化させる：溶液中に塩が存在すればするほど2本の鎖の結合は簡単になる。好ましい条件は同じ大きさ及び中程度の長さの標的及び捕獲ヌクレオチド配列によって得られる。

#### 【0056】

捕獲ヌクレオチド配列上の標的の極めて良好な捕獲率は、標的がPCR増幅後のように二本鎖であっても得られることができる。標的DNAのハイブリダイゼーションは拮抗反応である：標的鎖は固定された捕獲ヌクレオチド配列上にハイブリダイズすることができるがその相補的な鎖を有する溶液中では再結合することができる。溶液中の反応は溶液中の分子の自由な動きによって運動学的に常に有利である。反応速度は短い鎖の長さの平方根に比例している。捕獲ヌクレオチド配列が標的とほぼ同じ長さの場合、二つの反応は長さに依存しない。というの

も、それらは同一又は類似であるからである。同一捕獲ヌクレオチド配列の最適数はスポット毎に固定されており、従って、多数の捕獲ヌクレオチド配列は、拡散の強制によって得られた欠損を補充する。表面から一定の距離で配列されている中程度の長さの捕獲ヌクレオチド配列は拡散効果が低い。

#### 【0057】

反応溶液の他の構成成分も、緩衝液、界面活性剤、DMSO、又はサケDNAのように非特異的なDNAの添加物のように組み入れられなければならない。

#### 【0058】

アレイ上のハイブリダイゼーション後、標的配列は現行の技術によって検出されることができる。標識しない場合に好まれる方法はアレイに現在適応されているマススペクトロメトリー (US-A-5821060) 又は薬剤の挿入及びそれにつづく蛍光検出 (WO97/27329 又は Fodor 等、Nature 364, p.555(1993)) による標的の同定である。

#### 【0059】

標識を用いた検出は多数ある (WO97/27317 参照)。それらは、既に標識されたプライマーを用いるか、又は複製又は増幅工程中に標識されたヌクレオチドを組み入れることによって得られる。標識化は検出可能成分を試験されるRNA又はDNAにライゲーションすることによって得られることもできる (標識されたオリゴヌクレオチドはリガーゼによって配列の末端でライゲーションされる)。RNA又はDNA断片は、キナーゼ、トランスフェラーゼ又は同様の酵素を用いて、それらの5' OH末端又は3' OH末端において標識されたヌクレオチドを組み入れられることができる。

#### 【0060】

Cy3、Cy5及びCy7のような蛍光ヌクレオチド配列のような標識は商業的に利用可能なアレイスキャナー (General Scanning of Genetic Microsystem) を使用することによるアレイの分析に好適である。放射性標識、色素標識又は特定のリガンド (ストレプトアビジン又は抗体) によって後で認識される小分子による標識は、一般的な方法である。アレイ上に標的を固定した結果生ずる信号は蛍光、比色、拡散、エレクトロルミネセンス、生物学的又は化学的ルミネセンス

、磁氣的信号、又はインピーダンス測定又は電位測定のような電氣的信号である (U S - A - 5 3 1 2 5 2 7) 。本発明の二つの好ましい実施態様は蛍光検出か、又はスキャナーによって容易に検出及び定量される (E P - 9 9 8 7 0 1 0 6 . 4) 沈殿又は銀染色を得るために結合標的を金で標識することである。

#### 【0061】

各々のスポットについて得られた信号は記録され、信号の平均値が同一の捕獲ヌクレオチド配列について算出される。実際には少なくとも二つ、好ましくは三つから五つの同一のスポットが、過程のいかなる工程においても生じうる変動を補正するために各々のアレイ上に存在する。バックグラウンドの値は捕獲ヌクレオチド配列を有しないアレイの部分又は非特異的捕獲ヌクレオチド配列 (ネガティブコントロール) を有するスポット上で同定される。ポジティブコントロール (ハイブリダイゼーション溶液に加えられ、捕獲ヌクレオチド配列が、アレイの少なくとも一つのスポット上に存在するDNA配列) は、ハイブリダイゼーションの工程、使用される溶液及び条件、及び検出を試験するために添加されることが好ましい。様々な濃度で存在する異なるポジティブヌクレオチド配列は、信号の参照曲線を得るために試料に加えられることもできる。スポットの様々な信号は、その後、この参照曲線と比較されることができる。

#### 【0062】

定量はアレイ上のハイブリダイゼーション収率及び検出規模 (これは標的及び参照配列と同一である) 及び抽出、増幅 (又は複製) 及び標識する工程を考慮に入れる。内部標準は所定の配列 (参照) と比較される標的配列の測定によって定量において使用され、これに対して他の値が比較される。

#### 【0063】

外部標準も定量のために試料に加えられることができる。もしPCRが使用されれば、内部標準は同一プライマーによって増幅されるために標的と同一の配列をその末端に含む。それは、同じ長さのものであることもでき、同一GC含有量を有し、又は増幅工程中に実際に拮抗的であるために標的と同一であるその配列の大部分を有する。

#### 【0064】

## 実施例

### 実施例1. アレイ上の標的ヌクレオチド配列の検出

Schenaらによって述べられている方法(Proc. Natl Acad. Sci. USA 93, 10614 (1996))は誘導体化されたアルデヒドにアミノ化されたDNAを組み入れるために追跡された。長いアミノ化捕獲ヌクレオチド配列(100~400塩基)は150 nMの濃度でスポットされたが、小さなオリゴヌクレオチドは450 nMの濃度でスポットされた。捕獲ヌクレオチド配列はGenetix(UK)からの250  $\mu$ mのピン及びCell associates(Houston, USA)からのシリル化された(アルデヒド)顕微鏡スライドを使用して自家製のロボット装置でシリル化された顕微鏡スライド上に印刷された。スポットは直径400  $\mu$ mを有し、小分けされる量は約1 n lである。スライドは室温で乾燥され使用されるまで4℃で貯蔵された。

#### 【0065】

5  $\mu$ lのハイブリダイゼーション溶液は捕獲ヌクレオチド配列を有するガラススライド上に添加された。この混合物は以下のものを含んでいた: 2×SSC、4%のSDS、100  $\mu$ g/mlのサケ精子DNA、2 nMの437 bpのビオチン化CMV増幅単位、及び10 nMのビオチン化標的増幅単位。マイクロアレイはあらかじめ100%のエタノールで洗浄されたカバースリップで覆われた。スライドは95℃で5分間変性させられた。ハイブリダイゼーションは65℃で2時間行われた。試料はpH 7.5の10 mMのマレイン酸緩衝液、15 mMのNaCl、0.1%のTweenで4回洗浄された。

#### 【0066】

ガラス試料はコロイド金で標識されたストレプトアビジン800  $\mu$ lで、室温で45分間インキュベートされた。洗浄後、金の存在は染色透明溶液(Sigma St Louis, Mi)を用いた銀還元剤の触媒反応に役立った。スライドは室温で貯蔵される前に乾燥させマイクロアレイリーダーを用いて分析された。

#### 【0067】

実施例2: 様々な長さの捕獲ヌクレオチド配列上に中程度の大きさ(155 bp)の標的配列をハイブリダイゼーションさせた時に得られる感度の比較

捕獲ヌクレオチド配列の固定及び銀染色検出の方法は実施例1に記載されてい

る。捕獲ヌクレオチド配列及び標的DNAは以下のプライマーを使用するPCRによるCMV配列の増幅によって得られた。

【外1】

プライマー	配列 (5' → 3')	長さ (bp)	プライマーの位置 (d)
標的 <sup>a</sup>			
MIE-4	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAG		2223-2245
MIE-5c	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG	437	2657-2633
MIE-6c	GGCGATGGCCCGTAGGTCATCCA	155	2374-2352

捕獲ヌクレオチド配列 <sup>b</sup>			
MIE-4 <sup>c</sup>	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAG		2223-2245
MIE-6a	GCGGCGCTTCATTACACTGATAAC	56	2275-2252
MIE-6b	CGGCCCCCAGAATGTACTGGGCA	105	2324-2302
MIE-6c	GGCGATGGCCCGTAGGTCATCCA	155	2374-2352
MIE-6d	GTACAGGGGACTCTGGGGGTGAC	255	2474-2452
MIE-6e	CTGCTCACTTTCTTCCTGATCACTG	317	2536-2560
MIE-5c	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG	437	2657-2633

(a) プライマーMIE-4と共にプライマーMIE-5c又はMIE-6cを使用すると各々437及び155bpの標的DNAが生じた。

(b) プライマーMIE-4と共にプライマーMIE-6a、MIE-6b、MIE-6c、MIE-6d、MIE-6e又はMIE-5cを使用すると各々、56、105、155、255、317及び437bpの捕獲ヌクレオチド配列を生じた。

(c) MIE-4は5'末端でアミノ化された。

(d) MIE遺伝子中で連続的に数えられたヌクレオチド数として表記した。

【0068】

プラスミドpAT153-E(HCMV DNA AD169株のMIE遺伝子のエキソン4を含む)は1.5mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのTris pH

8. 4、50 mMのKCl、1  $\mu$ Mの各プライマー、100  $\mu$ Mの各dNTP、2.5 UのTaq DNAポリメラーゼGold及び10 ngのプラスミドpAT153-Eを含む全量100  $\mu$ l中でPCRによって増幅された。試料はまずポリメラーゼを活性化するために94℃で10分間変性させられた。その後、94℃ 30秒、65℃ 30秒及び72℃ 30秒、からなる増幅の40サイクル及び72℃ 10分の最後の伸長工程が行われた。水又は100コピーのプラスミドDNAが増幅のネガティブ又はポジティブコントロールとして各々使用された。標的DNAのPCRは100  $\mu$ Mのビオチン-16-dUTPも含む。

#### 【0069】

ハイブリダイゼーション工程は100 fモルのビオチン化標的DNAの存在下で65℃で2時間行われた。

#### 【0070】

実施例3： 長い標的増幅単位（437 bp）の固定率に対する捕獲ヌクレオチド配列の長さの影響

実験は実施例2で述べられている如く、MIE-4及びMIE-5cのプライマーを使用することによるプラスミドpAT153-Eの増幅によって得られた437 bpの標的を用いて行われた。ハイブリダイゼーションは実施例2のバイオチップ上で行われた。

#### 【0071】

実施例4： 同一アレイ上での異なる細菌種由来のFemA配列の検出

異なる種のプロウ球菌属の種に対応したFemA遺伝子は以下のプライマーを用いるマルチプレックスPCRによって別々に増幅される。

#### 【外2】

<i>S.</i> アウレウス 1 :	5' CTTTTCGCTGATCGTGATGACAAA 3'
<i>S.</i> アウレウス 2 :	5' TTTATTTAAAATATCACGCTCTTCG 3'
<i>S.</i> エピダーミディス 1 :	5' TCGCGGTCCAGTAATAGATTATA 3'
<i>S.</i> エピダーミディス 2 :	5' TGCATTTCCAGTTATTTCTCCC 3'
<i>S.</i> ハエモライティカス 1 :	5' CTATGGTATTAGCGGTAATTTTAG 3'
<i>S.</i> ハエモライティカス 2 :	5' TTTAATCTTTTGGAGTGTCTTATAC 3'
<i>S.</i> サプロフィティカス 1 :	5' TAAAATGAAACAACCTCGGTTATAAG 3'
<i>S.</i> サプロフィティカス 2 :	5' AAACATCCATACCATTAAAGTACG 3'
<i>S.</i> ホミニス 1 :	5' CGACCAGATAACAAAAAGCACAA 3'
<i>S.</i> ホミニス 2 :	5' GTAATTCGTTACCATGTTCTAA 3'

## 【0072】

これらのプライマーの位置及び異なるブドウ球菌属に対するそれらの特異性は図2に示されている。

## 【0073】

マルチプレックスPCRは以下のものを含む最終量50 $\mu$ l中で行われた：1. 5mMのMgCl<sub>2</sub>、10mMのTris pH8.4、50mMのKCl、0.8 $\mu$ Mの各プライマー、50 $\mu$ Mの各dNTP、50 $\mu$ Mのビオチン-16-dUTP、1.5UのTaq DNAポリメラーゼBiotools、7.5%のDMSO、5ngのFemA遺伝子を含むプラスミド。試料はまず94℃で3分間変性された。その後、94℃ 30秒、60℃ 30秒、及び72℃ 30秒からなる増幅40サイクル及び72℃で10分の最後の伸長工程が行われた。水が増幅のネガティブコントロールとして使われた。これらのプライマーを使って得られる増幅単位の大きさは*S.* サプロフィティカスに対して116bp、*S.* アウレウスに対して128bp、*S.* ホミニスに対して118bp、*S.* エピダーミディスに対して162bp、*S.* ハエモライティカスに対して160bpであった。

## 【0074】

捕獲ヌクレオチド配列の配列は対応する増幅単位及び一本鎖と同じであった。



## 【0075】

捕獲ヌクレオチド配列の固定、ハイブリダイゼーション及び銀染色検出の方法は実施例2で述べられているものである。

## 【0076】

実施例5： 配列の小部分の複製による異なる細菌由来の16S rRNAの検出

三つの異なる細菌（大腸菌、バクテロイズ・ディスタソニス(*Bacteroides distasonis*)及びビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*))の16S rRNA配列の特異的配列は開始ヌクレオチド配列及び16S rRNAにハイブリダイズして逆転写を停止するブロッキングヌクレオチド配列の両方を用いて複製された。特異的配列の複製は異なる細菌から抽出された2 $\mu$ gのトータルRNAで行われた。以下の配列が開始及びブロッキングヌクレオチド配列として使われた：

## 【外3】

- *E. coli* 用  
開始ヌクレオチド配列  
 5' CTCTGAAACTTCCGTGGATG 3'  
ブロッキングヌクレオチド配列  
 5' GTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCT 3'
- *B. ディスタソニス* 用  
開始ヌクレオチド配列  
 5' TACGATCCATAGAACCTTCATCCC3'  
ブロッキングヌクレオチド配列  
 5' CCTGCTTCATGCGGTATTAGTCCGAC3'
- *B. ロンガム* 用  
開始ヌクレオチド配列  
 5' CCACCGTTACACCGGAA3'  
ブロッキングヌクレオチド配列  
 5' CTCTCGCTTGCTCCCCGATA3'

## 【0077】

大腸菌、バクテロイズ・ディスタソニス及びビフィドバクテリウム・ロンガム用の開始ヌクレオチド配列は各々、16S rRNA上の995-1016、4

20-443、658-675の位置に位置している。

【0078】

大腸菌、バクテロイズ・ディスタソニス及びビフィドバクテリウム・ロンガム用のブロッキングヌクレオチド配列は各々16S rRNA上の778-797、172-198、441-460の位置に位置している。合成されたcDNAの長さは各々240塩基、273塩基及び236塩基である。

【0079】

ヌクレアーゼを含まないマイクロチューブで、0.5  $\mu$ gの開始ヌクレオチド配列及び2  $\mu$ gのブロッキングヌクレオチド配列が細菌から抽出された2  $\mu$ gのトータルRNAに添加された。ヌクレアーゼを含まない水が最終容量15  $\mu$ lになるよう添加された。逆転写は、アニールされたヌクレオチド配列／鋳型へ以下の成分を添加することによって行われた：5  $\mu$ lの5 $\times$ AMV RT緩衝液（250 mMのTris-HCl pH 8.3、250 mMのKCl、50 mMのMgCl<sub>2</sub>、50 mMのDTT及び2.5 mMのSpermidine）、40ユニットのRnasin<sup>®</sup>（Promega, Madison, US）、1 mMのdATP、1 mMのdCTP、1 mMのdGTP、0.65 mMのdTTP、0.35 mMのビオチン-dUTP及び30ユニットのAMV RT（Promega, Madison, US）。最終容量はヌクレアーゼを含まない水で25  $\mu$ lに調整された。反応混合物はそっと混合され、60℃で60分間インキュベートされた。

【0080】

異なる細菌から得られた一本鎖cDNAは実施例1の如くアレイ上でハイブリダイズ及び検出された。

【0081】

結果は三つの細菌の各々に対するcDNAの、それら各々の捕獲ヌクレオチド配列への特異的なハイブリダイゼーションを示した。それらの値はバックグラウンドレベルにあるので交差反応は存在しなかった。

【図面の簡単な説明】

【図1】

標的増幅単位のハイブリダイゼーション収率に対する捕獲ヌクレオチド配列の

長さの影響を示す。

【図2】

五つの異なる種のブドウ球菌属のFemA検出を模式的に表す。

【図3】

一つの開始ヌクレオチド配列を使用した5'末端における又は開始ヌクレオチド配列及びブロッキングヌクレオチド配列の両方を使用した配列に沿ったrRNAの配列の小部分の複製によるrRNAの検出を模式的に表す。

【図1】

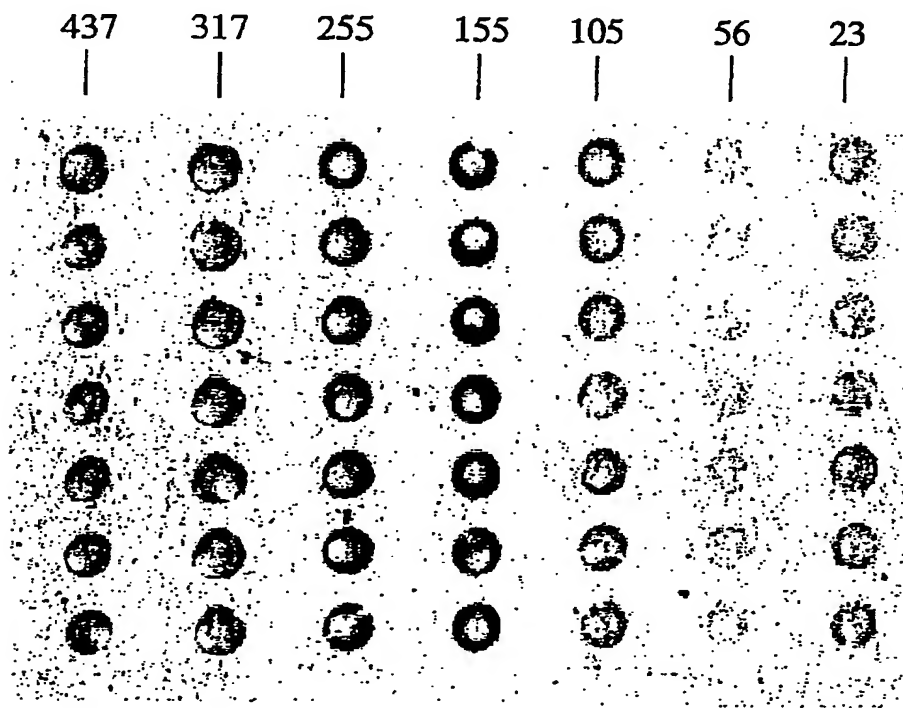
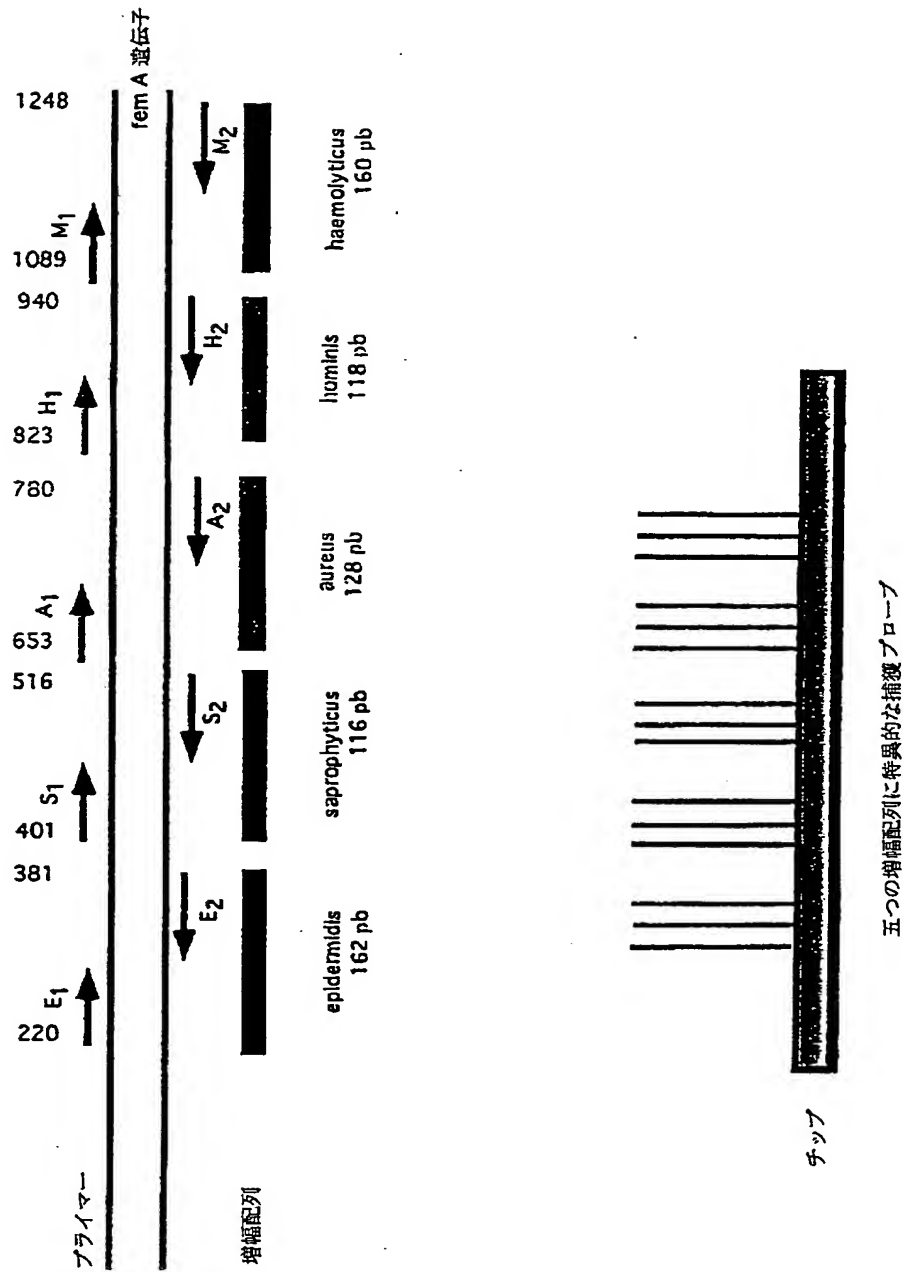


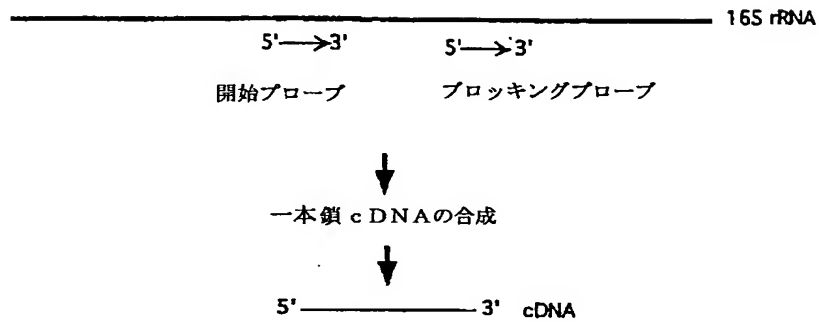
Fig. 1

【図2】

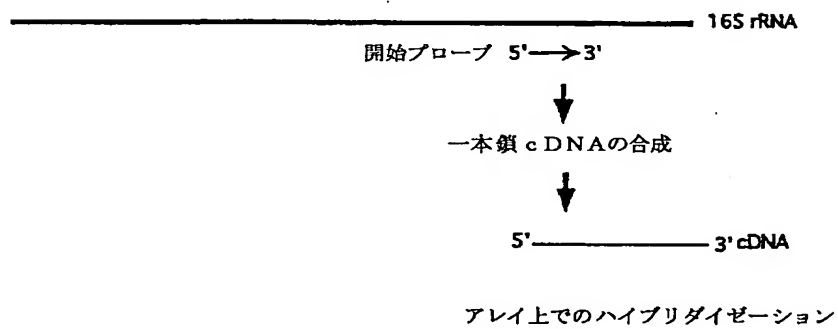


## 【図3】

## A) 16S rRNAの特異的部位の複製



## B) 16S rRNAの末端の複製

Fig. 3

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/BE 00/00123

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 29212 A (GINGERAS THOMAS A ;CHEE MARK S (US); STRYER LUBERT (US); AFFYMETRI) 14 August 1997 (1997-08-14) cited in the application see whole doc. esp. claims and examples	1-10
X	WO 98 11253 A (ERNEST ISABELLE ;REMACLE JOSE (BE); ALEXANDRE ISABELLE (BE); ZAMMA) 19 March 1998 (1998-03-19) cited in the application see whole doc. esp. claims	1-10
X	WO 99 16780 A (GALA JEAN LUC ;UNIV LOUVAIN (BE); MINISTERE DE LA DEFENSE NATION ()) 8 April 1999 (1999-04-08) cited in the application see whole doc. esp. p.12, lines 11-28	1-10
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority (claims) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*S\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2001

Date of mailing of the international search report

26/07/2001

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5618 Patentstein 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mueller, F

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No.  
PCT/BE 00/00123

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 27317 A (CHEE MARK ; LAI CHAOQIANG (US); LEE DANNY (US); AFFYMETRIX INC (US)) 31 July 1997 (1997-07-31) cited in the application see whole doc. esp. p.30, 1.1-20 and p.9, 1.5 ff.	1-10
X	WO 94 02634 A (UNIV SOUTH AUSTRALIA ; ADELAIDE CHILDREN S HOSPITAL (AU); HARRIS RA) 3 February 1994 (1994-02-03) see whole doc. esp. p.11 and p.14 ff	1-10
A	US 5 744 305 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 28 April 1998 (1998-04-28) see whole doc. esp. claims	
A	SCHENA M ET AL: "PARALLEL HUMAN GENOME ANALYSIS: MICROARRAY-BASED EXPRESSION MONITORING OF 1000 GENES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 93, no. 20, 1 October 1996 (1996-10-01), pages 10614-10619, XP002022507 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/BE 00/00123

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9729212 A	14-08-1997	AU 2189397 A EP 0937159 A JP 2000504575 T US 6228575 B	28-08-1997 25-08-1999 18-04-2000 08-05-2001
WO 9811253 A	19-03-1998	BE 1010608 A BE 1011052 A EP 0929696 A	03-11-1998 06-04-1999 21-07-1999
WO 9916780 A	08-04-1999	EP 1017850 A	12-07-2000
WO 9727317 A	31-07-1997	AU 2253397 A EP 0880598 A	20-08-1997 02-12-1998
WO 9402634 A	03-02-1994	AU 698934 B AU 4551193 A CA 2140877 A DE 69327326 D EP 0656068 A US 5849544 A	12-11-1998 14-02-1994 03-02-1994 20-01-2000 07-06-1995 15-12-1998
US 5744305 A	28-04-1998	US 5489678 A US 5445934 A US 5405783 A US 5143854 A US 5889165 A US 5753788 A US 6225625 B US 5510270 A AT 110738 T AT 175421 T AU 651795 B AU 5837190 A AU 672723 B AU 7765594 A BR 9007425 A CA 2054706 A DE 69012119 D DE 69012119 T DE 69032888 D DE 69032888 T DK 476014 T DK 619321 T EP 0476014 A EP 0619321 A EP 0902034 A EP 0953835 A ES 2058921 T ES 2129101 T GB 2248840 A,B HK 61395 A HK 64195 A HU 59938 A IL 94551 A JP 11315095 A JP 11021293 A JP 4505763 T KR 9701577 B	06-02-1996 29-08-1995 11-04-1995 01-09-1992 30-03-1999 19-05-1998 01-05-2001 23-04-1996 15-09-1994 15-01-1999 04-08-1994 07-01-1991 10-10-1996 04-05-1995 21-07-1992 08-12-1990 06-10-1994 22-12-1994 18-02-1999 29-07-1999 14-11-1994 30-08-1999 25-03-1992 12-10-1994 17-03-1999 03-11-1999 01-11-1994 01-06-1999 22-04-1992 05-05-1995 05-05-1995 28-07-1992 30-03-1995 16-11-1999 26-01-1999 08-10-1992 11-02-1997

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Appl. No.

PCT/BE 00/00123

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5744305 A		KR 9701578 B	11-02-1997
		WO 9015070 A	13-12-1990
		NL 191992 B	01-08-1996
		NL 9022056 T	02-03-1992
		NO 301233 B	29-09-1997
		NZ 233886 A	25-02-1993
		SE 13595 G	16-06-1995
		US 6197506 B	06-03-2001
		US 6124102 A	26-09-2000
		US 5744101 A	28-04-1998
		US 5547839 A	20-08-1996
		US 5770456 A	23-06-1998
		US 5800992 A	01-09-1998

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
G 0 1 N 33/53		C 1 2 R 1:44	
37/00	1 0 2	1:445	
//(C 1 2 Q 1/68		1:45	
C 1 2 R 1:44)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(C 1 2 Q 1/68			F
C 1 2 R 1:445)			
(C 1 2 Q 1/68			
C 1 2 R 1:45)			
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
(72)発明者	デ ロングヴィル, フランソワ ベルギー, ベー5100 ジャンベ, アヴ ェニユ ジャン マテルネ 110		
(72)発明者	アレクサドル, イザベル ベルギー, ベー5170 レシブ, ルー デッ サントル 3		
(72)発明者	アメル, サンドリン ベルギー, ベー6280 ロベルヴァル, アレ サン ウベル 4		
Fターム(参考)	4B024 AA11 AA19 CA01 CA11 CA20 HA14 HA20 4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA01 FA15 4B063 QA01 QA19 QQ06 QQ41 QQ54 QR32 QR62 QR82 QS25 QS36 QS39 QX02		